

**Metodologia para extração
de DNA em larga escala do
tecido foliar de *Brachiaria* (Syn.
Urochloa)**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte*

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 36

**Metodologia para extração de DNA
em larga escala do tecido foliar de
Brachiaria (Syn. *Urochloa*)**

Bruno da Costa Paniago

Letícia Jungmann

Cacilda Borges do Valle

Karem G. Xavier Meireles

Mariane de Mendonça Vilela

Aline de Oliveira

Bruno Ferreira dos Santos

Hugo Wosniak

Gisele Olivas de C. Leguizamon

Embrapa
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Av. Rádio Maia, 830 Vila Popular, CEP 79106-550

Campo Grande, MS

Fone: (67) 3368 2000 / Fax: (67) 3368 2180

<http://www.embrapa.br/gado-de-corte>

<http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Ronney Robson Mamede*

Secretário-Executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros: *Elane de Souza Salles, Lucimara Chiari, Davi José Bungenstab, Andréa Alves do Egito, Roberto Giolo de Almeida, Guilherme Cunha Malafaia*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Fotos: Bruno da Costa Paniago

1ª edição - Versão online (2015)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Gado de Corte.**

Metodologia para extração de DNA em larga escala do tecido foliar de *Brachiaria* (Syn. *Urochloa*) [recurso eletrônico] / Bruno da Costa Paniago... [et al]. – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2015.

24 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 36).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/bp/BP36.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 20 de dezembro de 2015).

Outros autores: Bruno da Costa Paniago; Letícia Jungmann; Cacilda Borges do Valle; Karem G. Xavier Meireles; Mariane de Mendonça Vilela; Aline de Oliveira; Bruno Ferreira dos Santos; Hugo Wosniak; Gisele Olivas de C. Leguizamon.

1. *Brachiaria* (Syn. *Urochloa*). 2. extração de DNA I. Paniago, Bruno da Costa. II. Jungmann, Letícia. III. Valle, Cacilda Borges do. IV. Meireles, Karem G. Xavier. V. Vilela, Mariane de Mendonça. VI. Oliveira, Aline de. VII. Santos, Bruno Ferreira dos. VIII. Wosniak. IX. Leguizamon, Gisele Olivas de C.

633.2 (21. ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2015

Sumário

| | |
|---|----|
| Introdução..... | 4 |
| Metodologia | 8 |
| Rendimento e qualidade de DNA extraídos pelo novo método de extração de DNA em larga escala com e sem incubação em banho-maria a 65°C | 13 |
| Validação da nova metodologia de extração de DNA em larga escala | 15 |
| Conclusões..... | 17 |
| Referências bibliográficas | 18 |

Metodologia para extração de DNA em larga escala do tecido foliar de *Brachiaria* (Syn. *Urochloa*)

Bruno da Costa Paniago¹; Leticia Jungmann²; Cacilda Borges do Valle³; Karem G. Xavier Meireles⁴; Mariane de Mendonça Vilela⁵; Aline de Oliveira⁶; Bruno Ferreira dos Santos⁷; Hugo Wosniak⁸; Gisele Olivas de C. Leguizamon⁹

Introdução

O uso de métodos biotecnológicos, entre eles a análise de fragmentos de DNA em estudos de melhoramento genético de forrageiras tropicais, se tornou indispensável na área da pesquisa e desenvolvimento.

Os programas de melhoramento genético de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte envolvem a avaliação e utilização de progênies intra e interespecíficas visando à seleção de genótipos superiores. Nesses programas, o número de indivíduos avaliados em campo e casas de vegetação tem se tornado cada vez maior, chegando a atingir a casa dos milhares.

Proporcionalmente, cresce a demanda por soluções biotecnológicas que

¹ Engenheiro-Agrônomo Mestre em Biotecnologia, CREA: 14677/D, Bolsa mestrado CAPES na Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, 830, Zona Rural, CEP: 70106-550, Campo Grande – MS.

² Bióloga, Dr. Pesquisadora, Embrapa Gado de Corte.

³ Engenheira-Agrônoma, Dr. Pesquisadora, Embrapa Gado de Corte.

⁴ Engenheira-Florestal, Dr. Pesquisadora, Embrapa Gado de Corte.

⁵ Bióloga, Analista B, Embrapa Gado de Corte.

⁶ Bióloga, bolsista AT (apoio técnico), Embrapa Gado de Corte.

⁷ Biólogo, bolsista AT (apoio técnico), Embrapa Gado de Corte.

⁸ Engenheiro-Agrônomo, bolsista AT (apoio técnico), Embrapa Gado de Corte.

⁹ Bióloga, Laboratorista, Embrapa Gado de Corte.

auxiliem a seleção precoce destas plantas, o que traz a necessidade de se ampliar a capacidade de geração de dados moleculares. Para tanto, é necessário dar agilidade ao processo de avaliação genômica dos candidatos à seleção, o qual envolve a extração de DNA de cada um dos indivíduos, seu sequenciamento ou avaliação por métodos baseados em PCR e a análise dos resultados.

Vários métodos de extração de DNA vegetal estão descritos em estudos científicos, sendo o método do detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1987) modificado por Bonato et al. (2002) o mais utilizado para obtenção de DNA de amostras de tecido foliar em gramíneas forrageiras dos gêneros *Panicum* e *Brachiaria*. Entretanto, o método tradicional de extração de DNA em tubos, utilizando maceração manual em cadinhos de porcelana, tornou-se inviável na aplicação de métodos genômicos no melhoramento, uma vez que o número de amostras extraídas por dia é bastante limitado por ser feito em tubos de PCR. Esse processo é laborioso, demorado e gera um volume considerável de resíduos químicos.

Neste contexto buscou-se desenvolver uma metodologia capaz de isolar DNA de amostras foliares em larga escala, com rendimento e qualidade satisfatórios para as subseqüentes análises moleculares realizadas no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte.

No melhoramento genético do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), Valdisser et al. (2013) adaptaram uma metodologia de extração de DNA e desenvolveram um protocolo de extração em larga escala usando 24 marcadores moleculares microssatélites (SSRs) como ferramenta molecular efetivamente operacional para a caracterização e discriminação individual de acessos de feijoeiro comum. Estudos similares que corroboram com esta pesquisa foram desenvolvidos por Lana et al. (2010) que apresentaram uma metodologia para a extração de DNA de folhas de milho e sorgo em grande escala, utilizando o triturador Geno/Grinder 2000. Maia et al. (2013) também modificaram e obtiveram um protocolo para extração de DNA em larga escala de folhas de soja.

Visto a funcionalidade dos métodos desenvolvidos atualmente foi possível adaptar o protocolo de extração de DNA de forrageiras. O novo método de extração de DNA de folhas de braquiária em larga escala apresentou algumas vantagens como a redução da quantidade de tecido vegetal, a rapidez do processo, exclusão da etapa de incubação em banho-maria e a redução do volume de resíduos em comparação com os processos tradicionais.

Neste documento, estão descritas as adaptações e testes realizados no protocolo de extração de DNA de folhas de *Brachiaria* sp. pelo método CTAB de Doyle e Doyle (1987) modificado por Bonato et al. (2002), a fim de ajustá-lo para o isolamento de DNA em larga escala.

Metodologia

Os testes para adaptação do protocolo foram realizados entre os anos de 2010 e 2013 em um estudo de determinação de metodologia para análise do fluxo gênico em *Brachiaria* usando marcadores microsatélites (PANIAGO et al. 2013).

As alterações realizadas no protocolo CTAB (Doyle e Doyle, 1987) modificado por Bonato et al. (2002) estão descritas a seguir:

Protocolo de extração de DNA de *Brachiaria* em sistema de larga escala, baseado no método CTAB (Doyle e Doyle 1987), e adaptado para extração em placas de 96 poços utilizando moinho vibratório (Retsch MM400):

1. Colocar no ultrafreezer (-80°C) os dois pares de adaptadores para placas do moinho vibratório, durante o tempo de preparação das amostras.

- *Jamais colocar os adaptadores em nitrogênio líquido!*

2. Coletar folhas jovens. Cortar aproximadamente 0,08 g de folhas em pedaços desconsiderando as partes mais fibrosas como a nervura ou recortar de 8 a 10 discos foliares de 6 mm com o uso de alicate perfurador.

3. Acondicionar as amostras foliares nos microtubos do tipo Tiertube – Micro Tubes Bulk (BioRad – Catalog #2239391) contendo duas esferas de inox de 3 mm posicionados nas estantes Tiertube 8x12 racks Empty (BioRad – Catalog #2239394). As estantes devem estar sem sua tampa inferior para que os microtubos permaneçam em contato com o gelo até o preparo da última amostra.

4. Congelar as amostras usando nitrogênio líquido por no mínimo 10 minutos.

5. Após o congelamento das amostras em nitrogênio líquido (N_2), levar as estantes com os tubos abertos para o ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos para que o N_2 possa sair dos tubos e evitar que ocorra a saída involuntária das amostras. Retire as estantes do ultrafreezer e feche os micros tubos com as tampas apropriadas. Coloque as estantes imediatamente no nitrogênio líquido e leve-as para o moinho vibratório MM400. Caso não for proceder a moagem no mesmo dia, as amostras poderão ficar armazenadas no ultrafreezer.

6. Tampe as estantes com as tampas apropriadas usando no interior da tampa uma manta de placa de PCR e papel toalha para ajudar a fixar os microtubos na estante. Coloque as estantes nos adaptadores de placa congelados e monte-os no moinho. Ajustar os seguintes parâmetros: frequência = 30 hz; Tempo = 1 minuto. Proceder à moagem.

7. Quando o aparelho finalizar o procedimento, rapidamente retire as estantes e observe se há amostras sem moer. Caso tenha, abra a tampa do microtubo com cuidado e pressione a amostra utilizando, por exemplo, uma ponteira limpa. Logo em seguida, congele os tubos no nitrogênio líquido e repita a etapa de moagem.

● *Se observar que as amostras podem estar descongelando, colocar as estantes novamente no N_2 líquido para evitar o descongelamento.*

● *Sempre que retirar as estantes do moinho, segure-as firmemente fazendo movimentos contra a bancada, ou forçando a descida do pó que*

está na tampa para o fundo do tubo usando centrifuga resfriada (spin) ou manualmente.

8. Em capela de exaustão, retirar as estantes do N₂ líquido e adicionar 500 µL de Tampão de Extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,4% 2-beta-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris – HCl pH 8; 1% PVP 40).

9. Colocar as tampas inferiores nas estantes e levar ao vortex para agitar até que todas as amostras estejam homogeneizadas.

10. Adicionar 250 µL de clorofórmio:álcool isoamilico (24:1; v:v). Tampar os tubos com novas tampas, colocar as mantas de PCR com papel toalha, e tampar a estante.

11. Inverter as placas suavemente por 5 minutos.

12. Centrifugar por 15 minutos, a 4000 rpm, sob temperatura ambiente.

13. Transferir 300 µL do sobrenadante para placas de poço profundo (1,1 mL - Axigen - P-DW-11-C) de 96 poços e adicionar igual volume de isopropanol gelado.

14. Tampar as placas com as mantas apropriadas, levar ao vortex pressionando suavemente e incubar a -20°C por 15 minutos.

● *Nesta etapa pode-se interromper o protocolo, incubando-se as amostras a 4°C durante a noite.*

15. Centrifugar por 30 minutos, a 4000 rpm, a 4°C e descartar o sobrenadante

● *Virar as placas de uma vez! E deixar a placa invertida em papel absorvente para escorrer o excesso de líquido e evitar contaminação entre os poços.*

16. Adicionar 100 µL de etanol 70% gelado.

17. Tampar as placas com manta e centrifugar por 20 minutos, a 4000 rpm, a 4°C.

18. Descartar o etanol 70% (*da mesma forma feita para o isopropanol, na etapa 15*) e deixar o *pellet* secar em estufa a 40°C.

19. Ressuspender o *pellet* em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e armazenar a -20°C.

As alterações no protocolo de Doyle e Doyle (1987) modificado por Bonato et al. (2002) foram realizadas com o objetivo de aumentar a capacidade de processamento diário de amostras usando uma metodologia em larga escala.

A substituição da maceração manual das amostras foliares pela moagem automatizada em moinho vibratório (Figura 1) permitiu aumentar a capacidade do número de amostras processadas de 30 amostras (capacidade dos equipamentos no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte) para 192 amostras por vez, ou seja, quase sete vezes maior que a capacidade atual (Tabela 1).

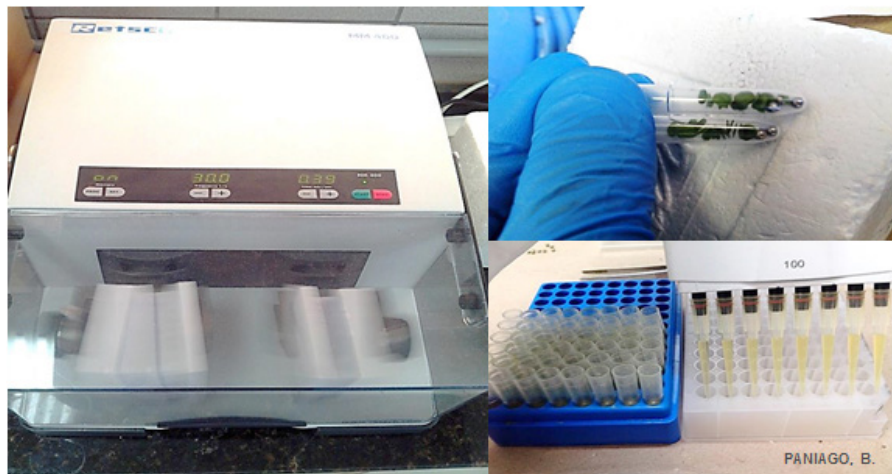


Figura 1. Preparo das amostras foliares em microtubos do tipo Titertube – Micro Tubes Bulk (BioRad – Catalog #2239391) para moagem no moinho vibratório (Retsch MM400) e transferência do sobrenadante dos microtubos para as placas de poço profundo (1,1 mL - Axigen - P-DW-11-C) de 96 poços.

Outras alterações foram importantes para viabilizar a extração de DNA em microtubos e placas de 96 poços: diminuição da quantidade de tecido foliar de 2,0 g para 0,08 g, diminuição dos volumes de reagentes e soluções utilizadas em todas as etapas do protocolo, eliminação da etapa de incubação em banho-maria a 65°C após adição do tampão de extração, redução no tempo de incubação com isopropanol, os tempos e as velocidades de centrifugação foram alterados para adaptar o processo à utilização de centrífugas de placas e, conseqüentemente, todas essas alterações levaram a redução do tempo total do processamento das amostras (Tabela 1).

O tempo necessário para o preparo inicial de 192 amostras foliares nos protocolos de extração de DNA convencional e de larga escala (A e B, Tabela 1), é praticamente o mesmo, sendo gasto um dia com oito horas de trabalho. O ganho de tempo é compensado durante as etapas seguintes do protocolo B, a começar quando as amostras já se encontram prontas para a moagem. Nesse caso, a vantagem do uso do método de extração de DNA em larga escala é a agilidade em processar 192 amostras por minuto no moinho vibratório, enquanto que pelo método tradicional a maceração das amostras em cadinho leva mais tempo, de 5 a 10 minutos por amostra.

Tabela 1. Comparação das etapas de extração de DNA foliar entre os protocolos de Doyle e Doyle (1997) modificado por Bonato et al. (2002) (A) e o novo protocolo em sistema de larga escala (B).

| Espécie | Protocolo | |
|--|-----------|-------|
| | A | B |
| Para uma amostra | | |
| Tempo do preparo inicial das amostras (da coleta ao armazenamento no ultrafreezer) (horas) | 8 | 8 |
| Amostra foliar (gramas) | 2 | 0,08 |
| Quantidade de amostras processadas e maceradas/minutos | 1/10 | 192/1 |

| | | |
|---|-----|-----|
| Tampão de extração (microlitros - μ L) | 900 | 500 |
| Incubação a 65°C em banho-maria | Sim | Não |
| Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (μ L) | 700 | 250 |
| Isopropanol (μ L) | 500 | 300 |
| Centrifugação com clorofórmio (minutos) | 10 | 15 |
| Sobrenadante (μ L) | 700 | 300 |
| Incubação a -20 °C com isopropanol (minutos) | 30 | 15 |
| Centrifugação com isopropanol (minutos) | 30 | 30 |
| Incubação com RNase | Sim | Não |

**Rendimento e qualidade de DNA
extraídos pelo novo método de ex-
tração de DNA em larga escala com
e sem incubação em banho-maria a
65°C**

Uma das mudanças importantes do novo protocolo foi à supressão da etapa de incubação das amostras em banho-maria a 65°C por 60 min, após a adição do tampão de extração ao macerado.

Com o objetivo de determinar se o rendimento e a qualidade do DNA extraído pelo método de extração de DNA em larga escala são prejudicados pela não incubação em banho-maria a 65°C, realizou-se o seguinte teste: DNAs de 192 amostras foliares de *B. brizantha* cv. Marandu foram extraídos em larga escala (nova metodologia) e o material dividido em duas placas com capacidade para 96 amostras. Durante a extração, uma placa com 96 amostras foi submetida à etapa de incubação a 65°C por 60 minutos, enquanto a outra placa com as outras 96 amostras seguiu para a próxima etapa do protocolo de extração, sem ser submetida à incubação.

O rendimento dos DNAs extraídos nas duas placas foi obtido com a leitura em espectrofotômetro (NanoDrop 1000 - *Thermo Scientific*).

A padronização da quantidade de folhas/amostra usada na extração em placa permitiu obter rendimentos e qualidade de DNA semelhantes entre grupos de amostras na placa. Isso é importante na rotina da banca, já que após obter os resultados da quantificação é possível agrupar as amostras com rendimentos semelhantes e fazer a diluição do DNA de forma homogênea. A vantagem da padronização da quantidade do material processado também reflete no ganho de tempo em escala de trabalho após a obtenção dos DNAs.

Das amostras incubadas a 65°C, os DNAs obtidos apresentaram rendimento médio de 293 ng/ μ L (Tabela 3, Anexo 1), ao passo que a concentração média dos DNAs isolados das amostras não incubadas foi de 230 ng/ μ L (Tabela 4, Anexo 2).

Como em ambos os protocolos, os DNAs são ressuspensos em um volume final de 100 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), entende-se que a metodologia tradicional disponibiliza 29 μ g de DNA/amostra, sendo superior em rendimento ao protocolo de extração em larga escala, que resulta em 23 μ g de DNA/amostra. Mesmo com essa diferença no rendimento do DNA entre os dois protocolos, o novo método de extração de DNA em larga escala foi considerado plenamente adequado para a realização das análises de rotina do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte. Esses resultados confirmam que a subtração da etapa de incubação do protocolo de extração não causa prejuízos no rendimento do DNA obtido.

Comparando-se os valores da *qualidade* dos DNAs extraídos para as amostras incubadas e não incubadas, observou-se que essa foi semelhante em ambas as condições testadas. De acordo com Riepl et al. (2011), a faixa de pureza do DNA indicada deve estar entre 1,8 e 2,2, na razão das absorbâncias obtidas a 260 nm e a 280 nm (260/280). Os valores da razão 260/280 das amostras incubadas e

não incubadas são apresentados nas tabelas 3 e 4 (anexos). Os resultados indicam que a etapa de incubação pode ser excluída do protocolo de extração de DNA de *Brachiaria* sem prejuízo quanto à pureza do DNA isolado.

Validação da nova metodologia de extração de DNA em larga escala

Depois de estabelecer o protocolo de extração de DNA em larga escala buscando facilitar a rotina do laboratório, foi realizado um teste para validar o novo método.

Para a extração de DNA seguindo o novo método, por meio do uso de placas de 96 poços, foram coletadas e preparadas amostras foliares de 384 indivíduos de *B. brizantha* cv. Marandu e *B. ruziziensis*. A extração foi feita seguindo todos os passos descritos na nova metodologia, utilizando-se moagem automatizada em moinho vibratório e sem a etapa de incubação a 65°C.

Devido o novo método ser baseado na metodologia tradicional de Doyle e Doyle (1987) com algumas modificações (BONATO et al. 2002), também foram realizadas extrações de DNA de tecido foliar de 26 indivíduos de diferentes espécies do gênero *Brachiaria* por meio da maceração manual, mantendo-se todas as etapas do método conforme o protocolo no Anexo 3. Deste modo, buscou-se evidenciar que o novo método é altamente confiável comparado à metodologia tradicional.

A concentração dos DNAs extraídos pela metodologia tradicional foi obtida em espectrofotômetro (NanoDrop 1000 - *Thermo Scientific*). Os valores obtidos do *rendimento* e da *qualidade* são apresentados na tabela 4. Os DNAs foram ressuspensos em um volume final de 100 µL de TE disponibilizando um rendimento médio de 176,3 ng/µL de DNA com o índice de pureza igual a 1,8. Esses valores indicam que a qualidade do DNA isolado atende aos critérios para ser utilizado em análises moleculares.

Tabela 2. Quantificação em espectrofotômetro (NanoDrop 1000 -Thermo Scientific) dos DNAs de espécies do gênero *Brachiaria* obtidos pelo método de extração manual usando o protocolo tradicional modificado por Bonato et al. (2002).

| Amostra | ng/ul | 260/280 | Amostra | ng/ul | 260/280 |
|---------|-------------|-------------|---------|--------------|-------------|
| 1 | 214,4 | 1,82 | 14 | 197,9 | 1,82 |
| 2 | 302,0 | 1,83 | 15 | 119,2 | 1,83 |
| 3 | 151,7 | 1,85 | 16 | 107,6 | 1,83 |
| 4 | 104,6 | 1,83 | 17 | 200,2 | 1,82 |
| 5 | 178,4 | 1,86 | 18 | 150,5 | 1,86 |
| 6 | 123,7 | 1,84 | 19 | 218,5 | 1,83 |
| 7 | 263,9 | 1,84 | 20 | <u>66,8</u> | <u>1,86</u> |
| 8 | <u>55,9</u> | <u>1,81</u> | 21 | 143,4 | 1,84 |
| 9 | 201,7 | 1,85 | 22 | 208,1 | 1,82 |
| 10 | 140,7 | 1,89 | 23 | <u>78,5</u> | <u>1,82</u> |
| 11 | 132,7 | 1,85 | 24 | 119,0 | 1,79 |
| 12 | 167,9 | 1,82 | 25 | 251,6 | 1,82 |
| 13 | 140,7 | 1,85 | 26 | 217,0 | 1,83 |
| Média | | | | 176,3 | 1,8 |

* Amostras sublinhadas não foram incluídas no cálculo da média.

Para validar o novo protocolo para extração de DNA em larga escala e demonstrar o potencial deste método, foi analisado o rendimento dos DNAs das 384 amostras de *Brachiaria* em espectrofotômetro NanoDrop (dados não apresentados) e o rendimento médio foi de 267 ng/ μ L. Observando os resultados do rendimento médio de DNA do primeiro teste relatado no início deste documento (230 ng/ μ L), referente à extração de 96 amostras foliares pelo novo método de extração em larga escala, nota-se a similaridade no rendimento do DNA com os dados obtidos nesse teste de validação. Considerando que nos dois testes o número de amostras é diferente

e os objetivos são distintos, ressalta-se a funcionalidade do protocolo de extração de DNA em larga escala em ambos os casos.

A partir dos resultados obtidos da extração de DNA de amostras foliares por meio dos métodos manual e automatizado, é possível afirmar que o rendimento e a qualidade/pureza alcançados estão de acordo com os padrões exigidos para a realização de análises moleculares no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte.

Estudo semelhante comprova a eficácia na modificação de um protocolo de extração de DNA de folhas de soja para adaptação em larga escala. Maia et al. (2013) obtiveram concentração média de DNA superior a 100 ng/ μ L, com razão 260/280 maior que 1,8, ou seja, a nova metodologia proporcionou DNAs de elevada pureza, além das vantagens de custo reduzido e menor toxicidade em relação aos métodos atualmente disponíveis.

Portanto, a nova metodologia de extração de DNA de folhas de *Brachiaria* sp. em larga escala assegura resultados equivalentes à metodologia tradicional com um ganho em eficiência. Proporciona alta capacidade de processamento de tecidos foliares, permitindo o atendimento às novas demandas dos programas de melhoramento genético de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte, contribuindo para o avanço das pesquisas moleculares com forrageira.

Conclusões

As vantagens em usar o novo método de extração de DNA de folhas de *Brachiaria* sp. em larga escala são:

- Agilidade do processamento após os preparativos iniciais das amostras foliares;
- Alta capacidade de processamento de tecidos foliares a partir da moagem automatizada e;
- Elevado rendimento e qualidade do DNA, semelhante à metodologia convencional.

Referências bibliográficas

BONATO, A. L. V.; VERZIGNASSI, J. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; LEGUIZAMON, G. O. de C. Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 78)

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11–15, 1987. Issue 1.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Brasil em números**: Efetivo dos rebanhos e das aves – 2011. Rio de Janeiro, v. 21, p. 212, 2013. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2/bn_2013_v21.pdf. Acesso em: 24 fev. 2014.

LANA, U. G de P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. da S.; OLIVEIRA, B. C. F. S.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V de; OLIVEIRA, B. C. F. S. Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 104)

MAIA, M. S.; BRUMER, B. B.; NOVAES, R. M. L.; SILVA, D. C. G.; KUWAHARA, M. K.; DALCIN, M. B.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ABDELNOOR, R. V. Método de extração de DNA de folhas de soja adaptado para larga escala. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 8, 2013, Londrina. Resumos expandidos... Embrapa Soja, 2013 p. 146-151. (Embrapa Soja. Documentos, 339).

PANIAGO, B. P.; JUNGSMANN, L.; VALLE, C.B. Determinação de metodologia para análise do fluxo gênico em *Brachiaria* usando marcadores microssatélites. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS, 2013.

RIEPL, M.; GRAEHL, H.; FUNK, H.; GAWANBACHT, A.; KLOPOCKI, E.; KARTHA, R. The Nano Photometer® Pearl Comparison of the performance characteristics of the New NanoPhotometer® Pearl and the NanoDrop 2000c. 2011. Publications NanoPhotometer®. Application Notes. Disponível em: <http://www.implen.de/publications/comparison-nano-drop-vs-nanophotometer>. Acesso em 20/04/2014.

VALDISSER, P. A. M. R.; MOTA, A. P. S.; BUENO, L. G.; MENEZES, I. P. P. de; COELHO, G. R. C.; MAGALHÃES, F. O. da C.; VIANELLO, R. P. Protocolo de extração de DNA e Genotipagem de SSRs em larga escala para uso no melhoramento de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 6 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico, 208).

ANEXOS

Anexo 1

Tabela 3. Rendimentos de DNA de amostras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu obtidos pelo método de extração de DNA adaptado para placas de 96 poços (extração de DNA em larga escala) com a etapa de incubação em banho-maria a 65°C analisadas em espectrofotômetro (NanoDrop 1000 -Thermo Scientific).

| Amostras incubadas em banho-maria a 65°C | | | | | |
|--|-----------|------------|---------|-----------|------------|
| Amostra | ng/ul | 260/280 | Amostra | ng/ul | 260/280 |
| 1 | 295 | 2,1 | 50 | 253 | 2,1 |
| 2 | <u>37</u> | <u>2,0</u> | 51 | <u>19</u> | <u>2,0</u> |
| 3 | 361 | 2,1 | 52 | 243 | 2,2 |
| 4 | 405 | 2,1 | 53 | 297 | 2,1 |
| 5 | 349 | 2,1 | 54 | 283 | 2,2 |
| 6 | 330 | 2,1 | 55 | 366 | 2,2 |
| 7 | 364 | 2,2 | 56 | 362 | 2,2 |
| 8 | 317 | 1,4 | 57 | 232 | 2,1 |
| 9 | 234 | 2,1 | 58 | 217 | 2,1 |
| 10 | 346 | 2,1 | 59 | 196 | 2,1 |
| 11 | 357 | 2,1 | 60 | 192 | 2,1 |
| 12 | 331 | 2,1 | 61 | 250 | 2,1 |
| 13 | 287 | 2,1 | 62 | 298 | 2,2 |
| 14 | 212 | 2,1 | 63 | 297 | 2,1 |
| 15 | 228 | 2,1 | 64 | 311 | 2,1 |
| 16 | 278 | 2,1 | 65 | 189 | 2,1 |
| 17 | 241 | 2,1 | 66 | 235 | 2,1 |
| 18 | 194 | 2,1 | 67 | 279 | 2,1 |
| 19 | 375 | 2,1 | 68 | 211 | 2,1 |
| 20 | 317 | 2,1 | 69 | 191 | 2,1 |
| 21 | 391 | 2,1 | 70 | 197 | 2,1 |
| 22 | 340 | 2,1 | 71 | <u>17</u> | <u>2,1</u> |
| 23 | 500 | 2,1 | 72 | 372 | 2,1 |
| 24 | <u>56</u> | <u>2,0</u> | 73 | 242 | 2,1 |
| 25 | 245 | 2,1 | 74 | 246 | 2,1 |

| | | | | | |
|----|-----|-----|--------------|------------|------------|
| 26 | 200 | 2,1 | 75 | 275 | 2,1 |
| 27 | 249 | 2,1 | 76 | 211 | 2,1 |
| 28 | 343 | 2,1 | 77 | 311 | 2,1 |
| 29 | 286 | 2,1 | 78 | 281 | 2,1 |
| 30 | 333 | 2,1 | 79 | 343 | 2,1 |
| 31 | 281 | 2,1 | 80 | 374 | 2,1 |
| 32 | 372 | 2,1 | 81 | 273 | 2,1 |
| 33 | 239 | 2,1 | 82 | 258 | 2,1 |
| 34 | 244 | 2,1 | 83 | 316 | 2,1 |
| 35 | 346 | 2,1 | 84 | 286 | 2,1 |
| 36 | 402 | 2,1 | 85 | 240 | 2,1 |
| 37 | 308 | 2,1 | 86 | 294 | 2,1 |
| 38 | 428 | 2,1 | 87 | 306 | 2,1 |
| 39 | 434 | 2,1 | 88 | 333 | 2,1 |
| 40 | 171 | 2,1 | 89 | 303 | 2,1 |
| 41 | 275 | 2,1 | 90 | 199 | 2,0 |
| 42 | 310 | 2,1 | 91 | 216 | 2,0 |
| 43 | 243 | 2,1 | 92 | 243 | 2,0 |
| 44 | 364 | 2,1 | 93 | 299 | 2,1 |
| 45 | 410 | 2,1 | 94 | 298 | 2,1 |
| 46 | 242 | 2,1 | 95 | 259 | 2,1 |
| 47 | 324 | 2,1 | 96 | 365 | 2,1 |
| 48 | 373 | 2,1 | Média | 293 | 2,1 |
| 49 | 242 | 2,1 | | | |

* Amostras sublinhadas não foram incluídas no cálculo da média devido problemas de operação do método.

Anexo 2

Tabela 4. Rendimentos de DNA de amostras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu obtidos pelo método de extração de DNA adaptado para placas de 96 poços (extração de DNA em larga escala) sem a etapa de incubação em banho-maria a 65°C analisadas em espectrofotômetro (NanoDrop 1000 -Thermo Scientific).

Amostras incubadas em banho-maria a 65°C

| Amostra | ng/ul | 260/280 | Amostra | ng/ul | 260/280 |
|----------------|--------------|----------------|----------------|--------------|----------------|
| 1 | 133 | 2,0 | 50 | 158 | 1,9 |
| 2 | 152 | 1,9 | 51 | 226 | 1,8 |
| 3 | 270 | 1,6 | 52 | 246 | 1,9 |
| 4 | 282 | 1,7 | 53 | 227 | 1,9 |
| 5 | 255 | 1,8 | 54 | 276 | 2,0 |
| 6 | 227 | 1,9 | 55 | 286 | 2,0 |
| 7 | 223 | 1,8 | 56 | 231 | 2,0 |
| 8 | 186 | 1,9 | 57 | 192 | 2,0 |
| 9 | 178 | 1,9 | 58 | 152 | 1,9 |
| 10 | 231 | 1,8 | 59 | 179 | 1,8 |
| 11 | 254 | 1,8 | 60 | 203 | 1,9 |
| 12 | 241 | 1,8 | 61 | 201 | 1,9 |
| 13 | 321 | 1,6 | 62 | 253 | 2,0 |
| 14 | 240 | 1,8 | 63 | 304 | 1,9 |
| 15 | 242 | 1,9 | 64 | 266 | 2,0 |
| 16 | 214 | 1,9 | 65 | 178 | 1,9 |
| 17 | 209 | 2,0 | 66 | 172 | 2,0 |
| 18 | 240 | 1,9 | 67 | 210 | 1,9 |
| 19 | 294 | 1,8 | 68 | 317 | 1,9 |
| 20 | 282 | 1,8 | 69 | 295 | 2,0 |
| 21 | 210 | 2,0 | 70 | 184 | 2,0 |
| 22 | 276 | 1,9 | 71 | 168 | 2,0 |
| 23 | 290 | 1,9 | 72 | 187 | 1,9 |
| 24 | 270 | 1,9 | 73 | 190 | 1,9 |
| 25 | 173 | 2,0 | 74 | 202 | 2,0 |
| 26 | 177 | 2,0 | 75 | 274 | 2,0 |
| 27 | 216 | 2,0 | 76 | 292 | 2,0 |

| | | | | | |
|----|-----|-----|--------------|------------|------------|
| 28 | 245 | 2,0 | 77 | 182 | 2,0 |
| 29 | 241 | 1,9 | 78 | 185 | 2,0 |
| 30 | 393 | 1,6 | 79 | 240 | 1,9 |
| 31 | 261 | 2,0 | 80 | 240 | 2,0 |
| 32 | 289 | 2,0 | 81 | 176 | 1,9 |
| 33 | 197 | 2,0 | 82 | 174 | 2,0 |
| 34 | 134 | 2,0 | 83 | 179 | 2,0 |
| 35 | 169 | 2,0 | 84 | 177 | 2,0 |
| 36 | 232 | 2,0 | 85 | 277 | 1,9 |
| 37 | 200 | 2,0 | 86 | 268 | 2,0 |
| 38 | 241 | 2,0 | 87 | 285 | 1,9 |
| 39 | 251 | 2,0 | 88 | 304 | 1,9 |
| 40 | 205 | 2,0 | 89 | 175 | 1,9 |
| 41 | 153 | 2,0 | 90 | 188 | 1,9 |
| 42 | 209 | 2,0 | 91 | 211 | 2,0 |
| 43 | 260 | 2,0 | 92 | 232 | 2,0 |
| 44 | 285 | 2,0 | 93 | 250 | 1,9 |
| 45 | 206 | 2,0 | 94 | 307 | 2,0 |
| 46 | 212 | 2,0 | 95 | 318 | 2,0 |
| 47 | 252 | 2,0 | 96 | 305 | 2,0 |
| 48 | 260 | 2,0 | Média | 230 | 1,9 |
| 49 | 144 | 2,0 | | | |

Anexo 3

Protocolo de extração de DNA de *Brachiaria* e *Panicum* – método CTAB de Doyle e Doyle, (1987) com algumas modificações de BONATO et al. (2002)

1. Preparar **Tampão de Extração**: PVP=0,10g para cada 10mL CTAB 5%.
2. Coletar folhas jovens e cortar em cadinhos de porcelana.
3. Macerar com **N₂ líquido** (não deixar descongelar) e transferir para um microtubo de 2mL, pouco menos da metade do microtubo.
4. Adicionar **Betamercaptoetanol** (20 μ L para cada 10mL) ao tampão de extração (misturar).
5. Adicionar 900 μ L de **Tampão de extração** (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,4% de 2-betamercaptoetanol; 20mM ETDA; 100mM Tris – HCl pH 8,0; 1% PVP 40). Vortexar até ressuspender todo o material.
6. Incubar as amostras a 65°C em banho-maria por 30-60 minutos, invertendo gentilmente a cada 10 minutos.
7. Retirar do banho-maria e deixar esfriar em T°C ambiente por 5 minutos.
8. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos.
9. Transferir 600 – 700 μ L de sobrenadante para novos microtubos de 2 mL.
10. Adicionar 600 -700 μ L de **Clorofórmio**: álcool isoâmílico (24:1) inverter cuidadosamente por 10 minutos.
11. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos.
12. Transferir 600-700 μ L de sobrenadante para novos microtubos de 2 mL.

13. Adicionar 600-700 μL de **Clorofórmio**: álcool isoâmílico (24:1). Inverter cuidadosamente por 10 minutos.

14. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos.

15. Transferir 500 μL de sobrenadante para tubos de 1,5mL e 500mL de **Isopropanol** gelado (manter no congelador), inverter suavemente e incubar a -20°C por 30 minutos.

16. Centrifugar por 30 minutos a 10.000 rpm, descartar o sobrenadante cuidadosamente. Deixar os tubos descansarem 10 minutos de cabeça para baixo.

17. Ressuspender o DNA em 400 μL de **TE** (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

Observação: Pode-se interromper o processo nesta etapa, armazenando a amostra a 4°C (geladeira).

18. Adicionar 10 μL de RNase e incubar a 37°C por 30 minutos.

19. Adicionar 40 μL de NaCl 5M e 800 μL de **Etanol absoluto** gelado. Inverter suavemente e incubar a -20°C por 30 minutos.

20. Centrifugar a 10.000 rpm por 30 minutos.

21. Descartar o sobrenadante cuidadosamente e lavar o pellet de DNA com etanol 70% gelado.

22. Descartar o etanol 70%, deixar secar e ressuspender em 100 μL de **TE**.

23. Armazenar a -20°C .



Gado de Corte

CGPE 12407

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**